

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 599.323.4 : 591.436.2.577.122+576.895.122

© «Паразитология, вып. 6, 1990

ДИНАМИКА КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ПЕЧЕНИ
ЗОЛОТИСТЫХ ХОМЯКОВ ПРИ ОПИСТОРХОЗЕ

Л. П. Долгачева, А. Г. Гиновкер, Г. Д. Миронова

На модели первичной описторхозной инвазии с помощью иммунохимических методов обнаружены значительные увеличения Ca^{2+} -транспортирующего гликопротеида (ГП) в печени зараженных животных. На 3-й день после заражения животного количество ГП увеличивается в 6 раз и достигает максимума на 7-й день. К 14-му дню количество ГП заметно снижается, а к 22-му возвращается на исходный уровень. Дальнейшее развитие инвазии не приводит к изменению содержания ГП. Предполагается, что индукция синтеза ГП, относящегося к системе электрогенного транспорта Ca^{2+} в митохондриях (МХ), вызвана увеличением концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Активация системы входа Ca^{2+} в МХ приводит, по-видимому, к увеличению концентрации ионов кальция в МХ, что вызывает активацию фосфолипазы, увеличение свободных жирных кислот и как следствие набухание МХ.

Молекулярные механизмы интеграции паразито-хозяинной системы при описторхозе остаются во многом неизученными. Это значительно затрудняет диагностику ранней фазы описторхоза и его латентной формы, разработку химио- и иммунопрофилактики.

Установлено, что заражение описторхозом приводит к изменению пролиферативных, органо-генетических и ультраструктурных свойств дуктулярного эпителия печени и прогрессивному замещению ее паренхимы стромой (Гиновкер, Зуевский, 1985; Гиновкер и др., 1983). Активация пролиферации клеток эпителия печени сопровождается значительным увеличением количества двух белков в зоне быстродвижущихся пептидов с м. м 40—44 КД (Гиновкер и др., 1984). Нами было высказано предположение, что одним из этих белков является гликопротеид (ГП), локализованный во внутренней мембране митохондрий (МХ). Этот белок участвует в электрогенном транспорте кальция (Миронова и др., 1980; Mironova e. a., 1982), имеет м. м 40 КД и обладает способностью активировать пролиферацию при введении извне за счет изменения, вероятно, концентрации кальция в клетке (Миронова, 1985).

Цель настоящей работы — выяснение роли изменения содержания кальцийсвязывающего белка (гликопротеида) в печени золотистых хомяков в острой и хронической стадиях описторхоза.

Материалы и методы. Исследования проводили в печени золотистых хомяков (самцов), зараженных метацеркариями *Opisthorchis felinus*. Животные были вскрыты на 3, 7,

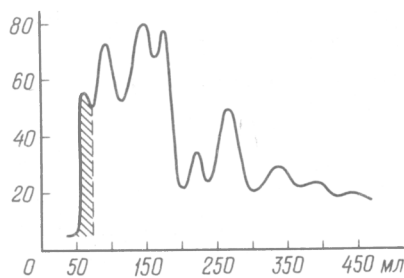


Рис. 1. Профиль элюции на колонке сефадекса Г-15 водного безлипидного экстракта из печени хомяков. Объем колонки (2.1 × 50 см), элюирование дистиллированной водой со скоростью 60 мл/час.

Фракция, обладающая Ca^{2+} -транспортирующей активностью, заштрихована. По оси ординат — поглощение при 254 нм, в %.

Fig. 1. Profile of elution on the column of sephadex G-15 of water lipid — free extract from liver of hamsters. Volume of column (2.1 × 50 cm), elution with distilled water at the rate of 60 ml/hr.

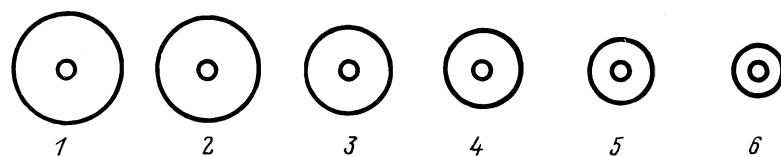


Рис. 2. Реакция Манчини с частично очищенным экстрактом, полученным из определенного количества ткани контрольного хомяка.

1 — экстракт из 960 мг ткани, 2 — из 480, 3 — из 240, 4 — из 120, 5 — из 60, 6 — из 30 мг.

Fig. 2. Manchini reaction with partially purified extract, obtained from definite amount of tissue of control hamster.

14, 22, 25, 97-й дни после заражения. Этанольный экстракт получали из 20 г печени по описанному ранее методу (Миронова и др., 1980).

Выделение ГП осуществляли в 2 этапа (Миронова е. а., 1982). Фракция, содержащая ГП (заштрихованный участок), исследовалась на содержание в ней белка (рис. 1). Измерение количества Ca^{2+} транспортирующего ГП проводили методом Манчини (Бэм, 1979) и Ухтерлоки (Гусев, 1968). При постановке реакции Манчини количество ГП в экстракте оценивали по диаметру кольца преципитата (рис. 2), при этом антитела к ГП получали иммунизацией кроликов (табл. 1). В реакции Ухтерлоки количество ГП определяли методом разведения исходного экстракта до исчезновения полосы преципитации (рис. 3). Параллельно проводили калибровку с известным количеством ГП. Гели окрашивали с помощью красителя кумасси ярко-голубого в модификации R-250.

Т а б л и ц а 1

Схема иммунизации кроликов митохондриальным Ca^{2+} -транспортирующим ГП
Scheme of immunization of rabbits with mitochondrial Ca^{2+} -transporting GP

Дни от начала иммунизации	Зона инъекции	Количество ГП для иммунизации (мкг)	Объем вводимого раствора (мл)
1	Левый подколенный лимфоузел	50	0.25
15	Правый подколенный лимфоузел	60	0.3
30	Краевая ушная вена	80	0.5
51	Внутримышечно	100	1.0

Результаты. Используемая в работе антисыворотка (АС) позволяет определять до 30 нг белка в смеси методом двойной радиальной иммунодиффузии. Это следует прежде всего из того факта, что минимальное количество форетически чистого ГП, которое дает видимую полосу

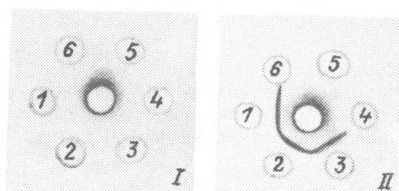


Рис. 3. Титрование форетически чистого ГП из сердца быка (I) и экстракта печени контрольного хомяка (II) методом двойной радиальной иммунодиффузии.

I: 1 — 30.7 мкг, 2 — 15.3, 3 — 7.6, 4 — 3.8, 5 — 1.9, 6 — 0.9 мкг; 7 — 480 нг, 8 — 240, 9 — 120, 10 — 60, 11 — 30, 12 — 15 нг; II: 1 — экстракт из 240 мг ткани, 2 — из 120, 3 — из 60, 4 — из 30, 5 — из 15, 6 — из 7.5 мг.

Fig. 3. Titration of phoretically pure GP from heart of ox (I) and extract of liver of control hamster (II) by the method of double radial immunodiffusion.

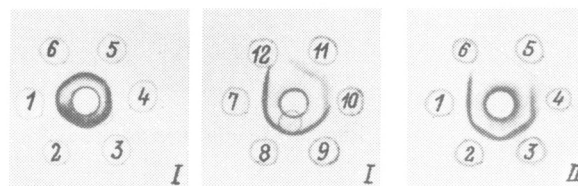


Рис. 4. Двойная радиальная диффузия экстракта, истощенного по ГП (I), и этого же экстракта с добавлением форетически чистого ГП (II).

I: 1 — экстракт из 960 мг ткани, 2 — из 480, 3 — 240, 4 — из 120, 5 — из 60, 6 — из 30 мг ткани; II: 1 — экстракт из 480 мг ткани+120 нг ГП; 2 — из 240 мг ткани+60 нг ГП; 3 — из 120 мг ткани+30 нг ГП; 4 — из 60 мг+15 нг ГП; 5 — из 30 мг+7.5 нг ГП; 6 — из 15 мг+3.75 нг ГП.

Fig. 4. Double radial diffusion of extract, exhausted by GP (I) and the same extract with addition of phoretically pure GP (II).

преципитации с используемой АС, равно 30 нг (рис. 3, I). Компоненты исследуемой фракции не оказывают существенного влияния на погрешность измерения указанным методом. Если исследуемую фракцию истощить по ГП с помощью ВгСN-агарозы (Остерман, 1983), а далее добавить к фракции известное количество чистого гликопротеида, то в этой смеси минимально определяемое количество ГП, так же как и при исследовании чистого ГП, равно 30 нг (рис. 4). Как следует из рис. 3, II, последняя полоса преципитации для контрольного животного соответствует квоте из 30 мг ткани.

Для определения количества ГП в экстрактах, кроме метода Ухтерлоки, использовали метод Манчини, позволяющий определить концентрацию белка по диаметру преципитата. Калибровочная кривая, полученная на электрофоретически чистом ГП, приведена на рис. 5. Как видно из рис. 3—5, используемые методы близки по чувствительности. Детальная характеристика выделения, очистки Ca^{2+} -транспортирующего гликопротеида митохондрий, его физико-химические параметры, адекватность и воспроизводимость иммунохимического подхода определения ГП описаны ранее (Миронова е. а., 1982).

Данные по измерению Ca^{2+} -транспортирующего ГП в экстрактах печени зараженных и контрольных животных представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Количество Ca^{2+} -транспортирующего ГП в печени золотистого хомяка в зависимости от стадии заражения животного

Amount of Ca^{2+} -transporting GP in the liver of golden hamster depending on the stage of infection of the animal

Дни после заражения	Количество исследуемых животных	Количество ГП в 1 г ткани (мкг)	
		по Ухтерлони	по Манчини
3	4	6.3 ± 0.9	16.7 ± 1.1
7	5	15.1 ± 1.1	
14	4	2.6 ± 0.04	
22	3	1.04 ± 0.03	
25	3	1.06 ± 0.04	1.3 ± 0.04
97	3	1.1 ± 0.03	
Контроль —	6	1.02 ± 0.04	1.1 ± 0.03

Как видно из табл. 2, уже в первые дни после заражения животного наблюдается значительное увеличение количества ГП в печени. На 3-й день после заражения количество ГП увеличивается в 6 раз и достигает еще большего значения на 7-й день после заражения животного. К 14-му дню количество ГП снижается, а к 22-му после заражения животного оно возвращается на исходный уровень.

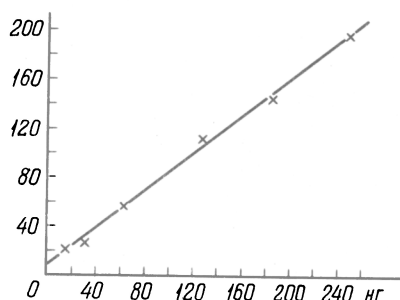


Рис. 5. Калибровочная кривая для определения ГП по методу Манчини.

По оси абсцисс — количество ГП, в нг; по оси ординат — квадрат диаметра зоны преципитации, в мм.

Fig. 5. Calibration curve for identification of GP by Mancini method.

Обсуждение результатов. Используемая в работе экспериментальная модель первичной описторхозной инвазии позволила обнаружить в начальной фазе заболевания значительные изменения в митохондриальной системе транспорта кальция. Изменения направлены на увеличение скорости электрогенного входа кальция в МХ, так как обнаружено увеличение в печени количества Ca^{2+} -транспортирующего ГП. Ранее нами было показано, что ГП участвует в процессе электрогенного входа кальция в МХ (Миронова и др., 1980; *Mironova et al.*, 1982). Полученные в работе данные позволяют объяснить нарушения в ультраструктуре МХ, наблюдаемые при описторхозе и выражающиеся в увеличении размеров МХ, просветлении и набухании их крист (Гиновкер, Зуевский, 1985). Увеличение количества Ca^{2+} -транспортирующего ГП в МХ приводит, по-видимому, к накоплению кальция в матриксе. Следствием этого могут являться активация фосфолипазы A_2 (Северина, Евтодиенко, 1981) и появление свободных жирных кислот, которые сами по себе способны вызывать разобщение и набухание МХ (Chan, Higgins, 1978; *Waite et al.*, 1969). Индукция синтеза митохондриального Ca^{2+} -транспортирующего ГП может быть обусловлена увеличением концентрации кальция в цитоплазме печеночных клеток, как это наблюдается при опухолях, когда увеличение ионов натрия в клетке приводит к увеличению количества Na^+ , K^+ -АТФазы (Boardman *et al.*, 1974). По нашим предварительным данным, в экстракте метацеркарий описторхов находятся компоненты, способные транспортировать ионы кальция через липидную мембрану. Поэтому внедрение личинок в паренхиму печени может способствовать увеличению входа ионов кальция по градиенту из внеклеточного пространства, где его концентрация равна $3 \cdot 10^{-3}$ М, в цитоплазму, в которой концентрация этих ионов значительно меньше — $1 \cdot 10^{-7}$ М.

Следует отметить, что увеличение в цитоплазме ионов кальция приводит к ряду неблагоприятных для клетки последствий, выражающихся, в частности, в активации процесса пролиферации и снижении процессов дифференцировки (Whitfield *et al.*, 1979). В связи с этим при увеличении ионов кальция в цитоплазме клетка стремится либо его выбросить во внеклеточное пространство, как правило, за счет активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена, либо поглотить его внутриклеточными органеллами, в первую очередь МХ (Rasmussen, 1968). Для обеспечения последнего, вероятно, и увеличивается при описторхозе мощность системы электрогенного транспорта кальция в МХ за счет увеличения количества Ca^{2+} -транспортирующего ГП. Предположение об увеличении концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток печени при описторхозе согласуется с активацией пролиферации гепатоцитов и дуктулярного эпителия в различные периоды инвазионного процесса (Гиновкер и др., 1979; Гиновкер и др., 1983; Гиновкер, Зуевский, 1985). Причем сравнение количества ГП печени (табл. 2), уровня митотической активности гепатоцитов (Гиновкер, 1982), содержания кальция в сыворотке крови (Гиновкер и др., 1988), форм проявления пролиферативных свойств дуктулярного эпителия (Гиновкер, Зуевский, 1985), направления дифференцировки последнего и печеночного эпителия (Гиновкер и др., 1985), позволяет постулировать существование связи между этими процессами, что обычно наблюдается при увеличении концентрации ионов кальция в цитоплазме (Whitfield *et al.*, 1979).

Таким образом, можно полагать, что разработка метода количественного определения Ca^{2+} -связывающего гликопротеида в сыворотке крови позволит стать ему индикатором ранней фазы описторхоза (в прелатентный период инвазии) и состояния клеточной активности печени. В свою очередь, это основа слежения за ходом инвазионного процесса, а также разработки мер профилактики холангиоцеллюлярного рака печени при описторхозе.

Список литературы

- Бэм Э. Простая радиальная иммунодиффузия по Манчини // Иммунологические методы. М.: Мир, 1979. С. 49—57.
- Гиновкер А. Г., Жвавый Н. Ф., Вахтель И. М., Коган Э. М., Немировский Л. Е. Динамика изменений стромально-паренхиматозных отношений в печени золотистых хомяков, инвазированных *O. felineus*. Совр. проблемы экспер. и клин. мед. Тр. II МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова. Сер. биол. 1979. Т. 126, вып. 3. С. 158.
- Гиновкер А. Г. Суточный митотический режим гепатоцитов при экспериментальном описторхозе // Мед. паразитол. 1982. № 5. С. 45—50.
- Гиновкер А. Г., Зуевский В. П., Шайн А. А. Дисрегуляция стромально-паренхиматозных отношений печени при описторхозе — фактор возможной бластоматозной трансформации // Современное представление о паренх. стромальных взаимоотношениях при предраках и раках различной локализации и их клиническое значение. Смоленск: СГМИ, 1983. С. 39—43.
- Гиновкер А. Г., Борщевская Т. А., Немировский Л. Е. Некоторые принципы адаптации клеток печени при описторхозе // ДАН СССР. 1984. Т. 276, № 4. С. 959—961.
- Гиновкер А. Г., Зуевский В. П. Ультраструктурный анализ гепатоцитов и эпителия желчных протоков печени золотистого хомяка при экспериментальном описторхозе // Мед. паразитол. 1985. № 5. С. 14—17.
- Гиновкер А. Г., Бычков В. Г., Соловьев Г. С. Влияние описторхозной инвазии на имплантационный рост эпителия печени // Бюл. экспер. биол. 1985, № 1. С. 99—102.
- Гиновкер А. Г., Пятерикова Н. А., Ананьев В. Н., Ананьева О. В. Особенности симпатико-адреналового контроля физиологических функций при описторхозе // Бюл. Сиб. отд. АМН СССР. 1988, № 4. С. 35—40.
- Гусев А. И. Микрометод преципитации в агаре // Иммунохимический анализ / Под ред. Зильбера Л. А. М.: Медицина, 1968. С. 99—119.
- Миронова Г. Д. Катион-транспортирующие белки митохондриальных и плазматических мембран: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пушино, 1985. 30 с.
- Миронова Г. Д., Сирота Т. В., Трофименко Н. В., Миронов Г. П., Кондрашова М. Н. Индукция кальциевой проводимости искусственных липидных мембран гликопротеном, выделенным из митохондрий и гомогената сердца быка // Биофизика. 1980. Т. 25, вып. 2. С. 276—280.
- (Миронова Г. Д., Сирота Т. В., Проневич Л. А., Трофименко Н. В., Миронов Г. П., Григорьев П. А., Кондрашова М. Н.) Mironova G. D., Sirota T. V., Pronovich L. A., Trofimenko N. V., Mironov G. P., Grigorjev P. A., Kondrashova M. N. Isolation and properties of Ca^{2+} -transporting glycoprotein and peptide from beef heart mitochondria // J. of Bioenerg. and Biomembr. 1982. Vol. 14, N 4. P. 213—225.
- Остерман Л. А. Иммуносорбенты для очистки антител // Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуно-электрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983. С. 109—112.
- Северина Е. П., Евтодченко Ю. В. Исследование локализации фосфолипазы A_2 в митохондриях // Биохимия. 1981. Т. 46, № 7. С. 1199—1201.
- Boagman L., Hult M., Lamb S. E., Newton S. P., Polson S. M. Evidence for the genetic control of the sodium pump density in the Hela cells // J. Physiol. 1974. Vol. 241. P. 771—794.
- Chan S. H. P., Higgins E. Jr. Uncoupling activity of endogenous free fatty acids in rat liver mitochondria // Can. J. Biochem. 1978. Vol. 56, 2. P. 111—116.
- Rasmussen H. In Williams textbook of endocrinology. Chapter II. Sunders Philadelphia, Pensilvan. 1968. P. 847—852.
- Waite M., Van Deenen L. L. M., Ruigrock T. J. C., Elbers P. F. Relation of mitochondria phospholipase activity in mitochondrial swelling // J. Lipid Res. 1969. Vol. 10, N 5. P. 599—608.
- Whitfield J. F., Boynton A. L., Macmanus S. P., Sikorska M., Tsang B. R. The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. Mol. Cell Biochem. 1979. Vol. 27, N 3. P. 155—179.

Институт биологической физики АН СССР,
Пушино, Московской обл.;
Государственный медицинский институт,
г. Тюмень

Поступила 19.10.1988
после доработки 21.03.1989

DYNAMICS OF CALCIUMFIXING LIVER PROTEIN IN GOLDEN HAMSTERS DURING
OPISTHORCHIASIS

L. P. Dolgacheva, A. G. Ginovker, G. D. Mironova

Key words: opisthorchiasis, Ca^{2+} -transporting glycoprotein, mitochondria

S U M M A R Y

By means of immunochemical methods a considerable increase in Ca^{2+} -transporting glycoprotein (GP) in liver tissues of golden hamsters at early stages of opisthorchiasis has been established. On the 3rd day after the infection GP amount increases 6 fold, on the 7th day — 15 fold. On the 14th day GP amount decreases but does not reach the control level. The control level is reached only on the 22nd day after the infection of animals. Ca^{2+} -transporting GP belongs to the system of electrogenic transport of Ca^{2+} in mitochondria (MCh) and its increase in MCh of the liver is, apparently, the basis of destructive changes of these organelles.
